تحقیقی

ناهنجاری‌های کروموزومی در بیماران مشکوک به آنمی فانکونی در آذربایجان شرقی

دکتر عظیم رضامند[۱]، مهرداد اصغری استیار[۲]، بهنیا صادقی[۳]، دکتر ابراهیم سخی نیا*[۴]

۱- استادیار گروه هماتولوژی و انکولوژی کودکان، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی، مرکز پژوهش‌های علمی دانشجویان، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- کارشناس ارشد آزمایشگاه، مرکز تشخیص ژنتیک تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ٤- دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

چکیده

زمینه و هدف : *آنمی فانکونی، شایع‌ترین آنمی آپلاستیک ارثی است که احتمال دارد سبب بروز ناهنجاری در هرکدام از اندام‌های اصلی بدن گردد. بنابراین تشخیص آن صرفاً براساس علائم بالینی غیرقابل اعتماد است. این مطالعه به منظور تعیین علایم بالینی و شکستگی‌های کروموزومی در افراد مشکوک به آنمی فانکونی در آذربایجان شرقی انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی روی ۲۰ بیمار مشکوک با احتمال ابتلا به آنمی فانکونی مراجعه کننده به مرکز تشخیص ژنتیک تبریز طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. پس از اخذ نمونه خون و تهیه کشت‌های مربوطه، نوع و تعداد ناهنجاری‌های کروموزومی تعیین شدند.*

یافته‌ها : *۹ بیمار دارای آنمی، ۸ بیمار با کمبود پلاکت و ۹ مورد نیز دارای ناهنجاری انگشتان دست بودند. با انجام آزمون سیتوژنتیک تشخیص آنمی فانکونی در ۵ مورد (۲۵ درصد) قطعی شد. درصد میتوزهای دارای ناهنجاری در کشت بدون مایتومایسین C در ۵ بیمار مبتلا از ۳۰-۵ درصد و در ۱۵ بیمار غیرمبتلا از صفر تا ٤ درصد متغیر بود. همچنین درصد میتوزهای دارای ناهنجاری در کشت واجد مایتومایسین C ۳۰ng/ml در ۵ بیمار مبتلا از ۷۸-۳۵ درصد و در ۱۵ بیمار غیرمبتلا از صفر تا ۲۰ درصد نوسان داشت.*

نتیجه‌گیری : *استفاده از آزمون سیتوژنتیک سبب تشخیص قطعی آنمی فانکونی در ۲۵ درصد از بیماران مشکوک به این بیماری گردید.*

کلید واژه‌ها : *آنمی فانکونی ، آنمی آپلاستیک ، شکستگی کروموزومی ، مایتومایسین C*

* نویسنده مسؤول : دکتر ابراهیم سخی نیا ، پست الکترونیکی esakhinia@yahoo.co.uk

نشانی: تبریز، خیابان گلگشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، تلفن ۳۳۷۰٦۸٤-۰٤۱۱ ، نمابر ۳۳۷۷۳۱۹

وصول مقاله : ۹۱/٦/۷ ، اصلاح نهایی : ۹۱/۱۰/۱۰ ، پذیرش مقاله : ۹۱/۱۲/۲۸

مقدمه

آنمی فانکونی (Fanconi anemia) شایع‌ترین آنمی آپلاستیک ارثی است که منجر به نارسایی مغز استخوان، ناهنجاری‌های مادرزادی و استعداد ابتلا به انواع بدخیمی‌ها می‌شود (۱). این بیماری در همه نژادها یافت می‌شود و میزان فراوانی آن یک مورد به ازای هر ۳۶۰۰۰۰ نفر برآورد شده است (۲و۳). فراوانی این بیماری به دلیل اثر موسس (Founder effect) و میزان بالای ازدواج فامیلی در برخی جمعیت‌ها از جمله اعراب سعودی، یهودیان اشکنازی، جمعیت ترک کشور ترکیه و احتمالاً جمعیت ایران زیاد است (۴-۲). این بیماری به صورت اتوزوم مغلوب به ارث می‌رسد و تاکنون جهش در حداقل ۸ ژن در بروز آن موثر شناخته شده است که با مطالعه آمیزش سلول‌ها (cell fusion) به ۸ گروه تقسیم‌بندی شده است (۵). آنمی فانکونی یک بیماری هتروژن است و احتمال دارد سبب بروز ناهنجاری در هرکدام از اندام‌های اصلی بدن گردد (۶و۷). در مطالعات مختلف نشان داده شده که بیماران مبتلا به آنمی فانکونی از نظر سن شروع بیماری، علایم و روند بالینی تفاوت‌های گسترده‌ای نشان می‌دهند. ناهمگونی‌های فنوتیپی میان خواهران و برادران مبتلا و حتی یک تخمی نیز گزارش شده است (۶و۷). به دلیل این تفاوت‌ها و همپوشانی این بیماری با تعداد زیادی از دیگر بیماری‌ها، تشخیص بیماری تنها بر پایه علایم بالینی دشوار و غیرقابل اعتماد است (۸و۹). تشخیص قطعی با بررسی شکست کروموزومی است. با مشخص شدن حساسیت غیرمعمول سلول‌های بیمار مبتلا به آنمی فانکونی نسبت به عوامل پیونددهنده عرضی بازهای نوکلئوتیدی (DNA cross-linking)، افزایش فراوانی شکست‌های کروموزومی تحت تاثیر این عوامل، به عنوان شاخص سلولی منحصر به فردی برای تشخیص پیش از تولد و پس از تولد به کار گرفته شد (۲و۱۰). شایع‌ترین این عوامل عبارت از دی‌اپوکسی بوتان DEB، مایتومایسین C و نیتروژن موستارد و ناهنجاری‌های کروموزومی

Archive of SID

www.SID.ir

حاصل از تاثیر آنها اغلب از نوع شکاف‌ها و شکست‌های کروماتیدی، اشکال شعاعی و نوآرایی‌های مرکب است (۱۱). حساسیت نسبت به این عوامل، چه قبل از ظهور علایم خونی و چه در مراحل ظهور آنمی‌آپلاستیک یا AML برای شناسایی بیماران، چه آنها که واجد ناهنجاری‌های مادرزادی هستند و چه آنها که فاقد این علایم هستند؛ سودمند است و از این طریق می‌توان در مواردی که بیماران نسبت به مواد آلکیلاسیون حساسیت نشان می‌دهند؛ روش‌های درمانی مناسبی را به‌کار گرفت (۲). با توجه به تعداد کم مطالعات انجام گرفته در این زمینه در ایران؛این مطالعه به منظور تعیین علایم بالینی و شکستگی‌های کروموزومی در افراد مشکوک به آنمی فانکونی در آذربایجان شرقی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی گذشته‌نگر روی ۲۰ بیمار مشکوک با احتمال ابتلا به آنمی فانکونی مراجعه کننده به مرکز تشخیص ژنتیک کلینیک تخصصی و فوق‌تخصصی شیخ الرئیس دانشگاه علوم پزشکی تبریز از ابتدای سال ۱۳۹۰ تا انتهای فصل بهار ۱۳۹۱ انجام شد.

بررسی ناهنجاری‌های بالینی در بیماران با مطالعه پرونده آنها و پرکردن پرسشنامه‌هایی که بدین منظور طراحی شده بود؛ انجام شد. مطالعه با رضایت‌نامه کتبی آگاهانه بیماران انجام شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (مطابق با بیانیه هلسینکی) مورد تایید قرار گرفت.

برای انجام آزمایشات سیتوژنتیکی از آزمودنی‌ها نمونه‌خون هپارینه به حجم ۴ سی‌سی اخذ شد. سپس سه کشت از نمونه خون محیطی هر بیمار و کنترل مربوطه با استفاده از دو غلظت متفاوت مایتومایسین C ۲۰ و ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (۲۴ ساعت قبل از مرحله هاروست) گذاشته شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت مراحل هاروست و لام‌گیری انجام و لام‌ها به روش رنگ‌آمیزی هموژن به‌وسیله گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. ۵۰ گستره متافازی از هر کشت مورد بررسی قرار گرفت و نوع و تعداد ناهنجاری‌های کروموزومی تعیین گردید. در نهایت با مقایسه سطح شکست کروموزومی در نمونه‌های بیمار و کنترل، تشخیص بیماری تایید و یا رد شد.

نمونه‌های کنترل به صورت تصادفی از افراد فاقد علایم بالینی مربوطه و با در نظر گرفتن شرایط سنی نسبت به گروه مورد مطالعه انتخاب شدند.

درصد میتوزهای دارای ناهنجاری از محاسبه تعداد میتوزهای دارای ناهنجاری کروموزومی تقسیم بر ۵۰ میتوز آنالیز شده، ضرب‌در عدد ۱۰۰ به دست آمد. همچنین میانگین شکست سلول از محاسبه تعداد کل شکست‌ها تقسیم بر ۵۰ میتوز آنالیز شده حاصل شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش‌های آماری توصیفی استفاده شد.

یافته‌ها

میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۹/۶ سال بود. پایین‌ترین و بالاترین سن در افراد مورد مطالعه به ترتیب ۲۱ روزه و ۲۱ ساله بود.

سابقه فامیلی این بیماری در همه بیماران منفی بود. نیمی از بیماران مذکر و بقیه مؤنث بودند. ۸ مورد از والدین بیماران دارای نسبت خویشاوندی بودند که از این میان رابطه فامیلی ۷ مورد درجه سه (پسردایی-دخترعمه) بود. ۹ مورد از بیماران آنمی داشتند که با علایمی مانند رنگ‌پریدگی، خستگی و ضعف همراه بود. ۸ بیمار با کمبود پلاکت به همراه علایم خونریزی‌های خودبه‌خودی و کبودی همراه بودند و ۹ مورد نیز ناهنجاری انگشتان دست داشتند.

تشخیص آنمی فانکونی در ۵ مورد با آزمون سیتوژنتیک قطعی شد. به عبارتی از ۲۰ بیمار مشکوک به آنمی فانکونی، ۲۵درصد مبتلا و ۷۵درصد غیرمبتلا بودند.

یک بیمار علاوه بر تشخیص قطعی آنمی فانکونی، دارای سندرم ترنر نیز بود (شکل یک) که در علایم بالینی این بیمار کوتاهی قد، ناهنجاری انگشتان دست، آنمی و کمبود پلاکت مشاهده شد.

همچنین در یک مورد از بیمارانی که در بررسی سیتوژنتیکی تعداد شکست‌های کروموزومی به صورت شاخصی وجود آنمی فانکونی را تایید نمود؛ در مطالعات کروموزومی به روش G-BANDING تغییراتی به صورت Deletion در بازوی کروموزوم شماره ۹ و شکستگی (Gap) در اکثر کروموزوم‌های گروه A,B را به وضوح نشان داد. همچنین این بیمار دارای علایم میکروسفالی، ناهنجاری انگشتان دست، آنمی، مشکلات قلبی و کلیوی بود.

نتایج درصد میتوزهای دارای ناهنجاری و میانگین شکست در هر سلول، در کشت‌های فاقد و واجد مایتومایسین C با غلظت‌های ۲۰ و

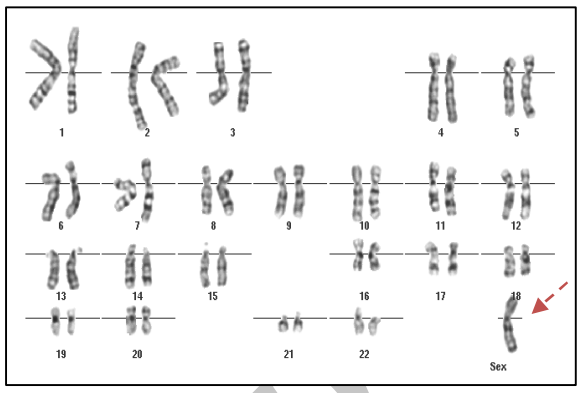
جدول ۱ : درصد میتوزهای دارای ناهنجاری و میانگین شکست در هر سلول در کشت‌های فاقد و واجد مایتومایسین C با غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر

	مبتلا به آنمی فانکونی (n=5)	عدم ابتلا به آنمی فانکونی (n=15)	کنترل
درصد میتوزهای دارای ناهنجاری در کشت بدون MMC	۵-۳۰	۰-٤	۰-٤
درصد میتوزهای دارای ناهنجاری در کشت واجد MMC (۲۰ ng/ml)	۲۰-۵۰	۰-۰/۲	۰-۰/۵
درصد میتوزهای دارای ناهنجاری در کشت واجد MMC (۳۰ ng/ml)	۳۵-۷۸	۰-۲۰	۰-۹
میانگین شکست کروموزومی پایه (بدون تاثیر MMC) در هر سلول	۰/۰٤-۰/۰۵	۰-۰/۰۵	۰-۰/۰٦

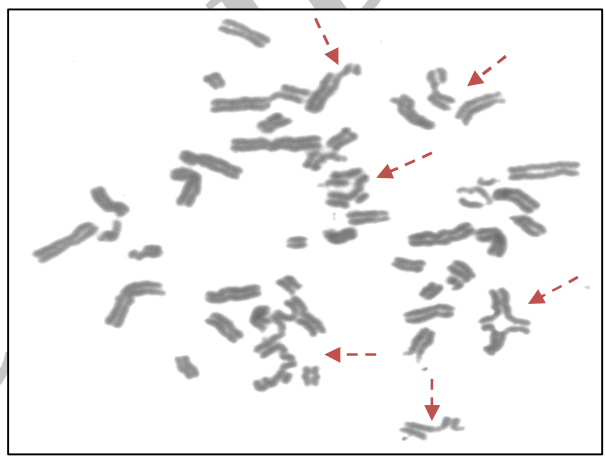
MMC : مایتومایسین C

Archive of SID
www.SID.ir

۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در جدول یک آمده است. همچنین نمونه کروموزوم‌های بیمار مبتلا به آنمی فانکونی پس از استفاده از مایتومایسین C در شکل ۲ قابل مشاهده است.



شکل ۱ : کاریوتایپ بیمار مبتلا به آنمی فانکونی و سندرم ترنر



شکل ۲ : کروموزوم‌های بیمار مبتلا به آنمی فانکونی پس از استفاده از مایتومایسین C

بحث

در مطالعه حاضر با استفاده از آزمون سیتوژنتیک برای ۲۵ درصد از بیماران تشخیص قطعی آنمی فانکونی داده شد. این یافته با مطالعه قاسمی فیروزآبادی در تهران مطابقت داشت (۱۲). اگرچه فراوانی آن نسبت به مطالعه حاجیان‌پور و همکاران (۳) در جمعیت ایرانی (۶۰ درصد)، کمتر بود. دلیل این مغایرت می‌تواند ناشی از تفاوت در حجم نمونه مورد مطالعه باشد. این در حالی است که بعضی از مطالعات انجام گرفته در کشورهای دیگر میزان فراوانی را بسیار کمتر از مطالعه حاضر گزارش کرده‌اند (۱۳و۱۴). این خود می‌تواند نتایج مطالعه حاجیان‌پور و همکاران (۳) را مبنی بر فراوانی بیشتر مبتلایان به آنمی فانکونی در ایران در مقایسه با دیگر کشورها اثبات کند.

در مطالعه ما یافته‌های حاصل از بیماران غیرمبتلا به آنمی‌فانکونی در مقابل مایتومایسین C با غلظت‌های متفاوت در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت چندانی نشان نداد. در این مطالعه سیتوژنتیکی اکثر شکستگی‌های از نوع دی‌سانترومری، اشکال شعاعی، GAP و صلیبی، آنمی فانکونی محسوب شد و در تشخیص قطعی این بیماری نقش مهمی داشت. امروزه در دنیا به علت شناسایی ژن‌های مسؤول این بیماری، روش‌های مولکولی نوین به عنوان روش تشخیص قطعی محسوب می‌شوند؛ اما به دلیل این که در حال حاضر در ایران انجام این تست‌ها مقدور نیست و از سویی دیگر با توجه به تعداد ژن‌ها و تنوع گسترده جهش‌ها تا به امروز، جز در موارد معدودی مثل ژن FAC در جمعیت اشکنازی یهود، استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی عملاً امکان‌پذیر نیست (۱۵). به همین دلیل اهمیت بالای بررسی سیتوژنتیکی در تشخیص این بیماری همچنان به حال خود باقی است.

براساس یافته‌های حاصل از این مطالعه، درصد میتوزهای دارای ناهنجاری و میانگین شکست کروموزومی در بعضی از بیماران مبتلا به آنمی فانکونی مشابه با بیماران غیرمبتلا و نمونه‌های کنترل بود که با نتایج حاصل از مطالعات دیگر همخوانی دارد (۹و۱۶). همچنین مانند مطالعات قبلی مطالعه حاضر نیز نشان داد که با توجه به همپوشانی بالای این بیماری با طیف وسیعی از بیماری‌ها و گوناگونی بالینی آن، انجام آزمون سیتوژنتیکی برای تشخیص قطعی همچنان به قوت خود باقی است.

یافته دیگر این مطالعه وجود رابطه خویشاوندی نوع پسردایی – دخترعمه در بیش از ۳۵ درصد از بیماران مشکوک دچار ناهنجاری بود که دلیلی بر ارتباط این نوع از ازدواج فامیلی در ابتلا به این ناهنجاری‌ها است. در مطالعه حاضر میانگین سنی ۹/۶ بود که با مطالعه Butturini و همکاران مطابقت داشت (۱۷).

باتوجه به محدودیت تعداد بیماران مطالعه حاضر توصیه می‌گردد تا در بیمارانی که به وسیله آزمون سیتوژنتیکی تشخیص قطعی آنمی‌فانکونی داده می‌شود؛ بررسی‌های بالینی بیشتری با حجم نمونه بیشتری برای آگاهی پزشکان از علایم گوناگون و با جزئیات بیشتر این بیماری هتروژن و ناشناخته صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه استفاده از آزمون سیتوژنتیک سبب تشخیص قطعی آنمی فانکونی در ۲۵ درصد از بیماران مشکوک به این بیماری گردید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همه بیماران و والدین آنان که در انجام این مطالعه، ما را یاری نمودند؛ سپاسگزاری می‌نماییم.

www.SID.ir

References

1. Beulter E, Litohman M, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. William's Hematology. 6th. New York: Mcgraw Hill. 2001; pp: 378-9.

2. Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. Fanconi Anemia. In: Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. 2nd. New York: McGraw Hill. 2002; p:289.

3. Hajianpour AK. [High incidence of Fanconi anemia: associated with high rate of consanguineous marriages in Iran]. The first congress of genetic disorders and disabilities in Iran. 1999. [Persian]

4. D'Andrea AD, Grompe M. Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. Blood. 1997 Sep; 90(5):1725-36.

5. Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. J Med Genet. 2003 Jan;40(1):1-10.

6. Esmer Sánchez MC, Carnevale Cantoni A, Molina Alvarez B, Cruz-Alcívar R, Sánchez Sandoval S, Gómez Laguna L, et al. [Clinical and cytogenetic variability in 12 Mexican families with Fanconi's anemia and its relationship with the complement gruoup to which they belong]. Rev Invest Clin. 1999 Sep-Oct;51(5):273-83. [Article in Spanish]

7. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. Blood. 2000 Dec;96(13):4064-70.

8. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. Am J Med Genet. 1997 Jan;68(1):58-61.

9. Auerbach AD, Ghosh R, Pollio PC, Zhang M. Diepoxy butane test for prenatal and postnatal diagnosis of Fanconi Anemia. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G. Fanconi Anemia, Clinical Cytogenetic and Experimental Aspects. 4th. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 1989; p:71.

10. Buchwald M, Moustacchi E. Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing of DNA damage? Mutat Res. 1998 Aug; 408(2):75-90.

11. Miller QJ, Therman E. Human Chromosome. 4th. NewYork: Springer-Verlag. 2001; pp:207-21.

12. Ghasemi Firouzabadi S, Shafeghati Y, Keyhani E, Kariminejad R, Oloomi Z, Moosavi F, et al. [Clinical heterogeneity and chromosome breakage in Iranian patients suspicious of Fanconi anemia]. Tehran Univ Med J. 2007;65(9):20-5. [Article in Persian]

13. Hou JW, Wang TR. Differentiation of Fanconi anemia from aplastic anemia by chromosomal breakage test. Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi. 1997 Mar-Apr;38(2):121-6.

14. Xie Y, de Winter JP, Waisfisz Q, Nieuwint AW, Scheper RJ, Arwert F, et al. Aberrant Fanconi anaemia protein profiles in acute myeloid leukaemia cells. Br J Haematol. 2000 Dec;111(4): 1057-64.

15. Lipton JM, Coppes MJ. Fanconi Anemia. Available at: http://emedicine.medscape.com/article/960401-overview

16. Cervenka J, Arthur D, Yasis C. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia. Pediatrics. 1981 Jan;67(1):119-27.

17. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. Blood. 1994 Sep; 84(5):1650-5.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Paper

Chromosomal aberrations in patients suspected with the risk of Fanconi anemia

Rezamand A (MD)[1], Asghari Estiar M (MSc)[2], Sadeghi B (MSc)[3], Sakhinia E (PhD)*[4]

[1]Assistant Professor, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2]MSc Student of Medical Genetics, Scientific Research Center, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]MSc in Laboratory Sciences, Tabriz Genetic Analysis Center (TGAC), Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [4]Associate Professor, Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Fanconi anemia is the most prevalent inherited aplastic anemia. Diagnosis based solely on the recognition of clinical symptoms is not reliable. This study was done to determine chromosomal aberrations in patients suspected with the risk of Fanconi anemia in the Eastern Azarbaijan province- Iran.

Materials and Methods: This descriptive study was conducted on 20 patients in the Eastern Azarbaijan province-Iran. The cytogenetic method was used to determine type and number of chromosomal disorders.

Results: Nine eight and nine patients had co-morbid anemia, platelet deficiency and 9 patients had hand and finger deformities, respectively. Using cytogenetic method, Fanconi anemia was confirmed in 5 (25%) of the cases. The percentage of mitotic abnormalities in the chromosomes without administration of mitomycin C varied between 5-30% in the cultures of the 5 affected and between 0-4% in the 15 unaffected patients with the administration of mitomycin C, the percentages were increased up to 35-78% and 0-20% in affected and unaffected patients, respectively.

Conclusion: Fanconi anemia is confirmed precisely in 25% of suspected patients using cytogenetic method.

Keywords: Fanconi anemia, Chromosomal breakage, Mitomycin C

*** Corresponding Author: Sakhinia E (PhD), E-mail: esakhinia@yahoo.co.uk**

Received 28 August 2012 **Revised** 30 December 2012 **Accepted** 17 March 2013

Archive of SID

This paper should be cited as: Rezamand A, Asghari Estiar M, Sadeghi B, Sakhinia E. [Chromosomal aberrations in patients suspected with the risk of Fanconi anemia]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 15(4): 79-83. [Article in Persian]

www.SID.ir